

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



#2
23. Aug. 2000

REC'D 08 NOV 2000
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

EP 00/08234

Aktenzeichen: 199 40 389.9
Anmeldetag: 25. August 1999
Anmelder/Inhaber: Wilex Biotechnology GmbH,
München/DE
Bezeichnung: Selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogen
Aktivators
IPC: C 07 C, A 61 K, C 07 D

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebinger

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 45563 0

TELEX 522 621

TELEFAX (089) 45563 999

E-MAIL email@weickmann.de

Unser Zeichen:
20538P DE/WWvo

Anmelder:
Wilex Biotechnology GmbH
Grillparzerstraße 10B

81675 München
DE

Selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogen Aktivators

Selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogen Aktivators

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue selektive Inhibitoren des Urokinase-Plasminogenaktivators (uPA, EC 3.4.21.31) vom Arylguanidintyp.

10

Der Plasminogenaktivator von Urokinase-Typ (uPA) spielt eine Schlüsselrolle bei der Tumordinvasion und Metastasenbildung (Schmitt et al., J. Obst. Gyn. 21 (1995), 151-165). uPA wird in verschiedenen Arten von Tumorzellen überexprimiert (Kwaan, Cancer Metastasis Rev. 11 (1992), 291-311) und bindet an den Tumor-assoziierten uPA-Rezeptor (uPA-R), wo die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin stattfindet. Plasmin ist in der Lage, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibronektin, Laminin und Kollagen Typ IV abzubauen. Es aktiviert auch einige andere ECM-abbauende Enzyme, insbesondere Matrix-Metalloproteinasen. Hohe Mengen an Tumor-assoziiertem uPA korrelieren mit einem höheren Metastasierungsrisiko für Krebspatienten (Stephens et al., Breast Cancer Res. & Treat. 52 (1998), 99-111). Eine Hemmung der proteolytischen Aktivität von uPA ist daher ein guter Ansatzpunkt für eine anti-metastatische Therapie.

20

25

30

Ein gemeinsames Merkmal vieler bekannter synthetischer uPA-Inhibitoren ist ein basischer Rest, der Amidino- oder Guanidino-Gruppen enthält, und an Asp¹⁸⁹ in der S1-Spezifitätstasche von uPA binden kann und dort als Arginin-Mimetikum wirkt (Spraggon et al., Structure 3 (1995), 681-691). Die meisten der bekannten Inhibitoren sind jedoch nicht selektiv für uPA, sondern hemmen auch andere Serinproteasen wie Trypsin, Thrombin, Plasmin oder Gewebs-Plasminogenaktivator (tPA).

p-Aminobenzamidin ist ein moderat selektiver uPA-Inhibitor mit einer Hemmkonstante von $82 \mu\text{M}$. Billstroem et al. (Int. J. Cancer 61 (1995), 542-547) konnten eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate von DU145 Tumoren (eine Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie) in SCID Mäusen bei oraler
5 Verabreichung in einer Tagesdosis von 125 bis 250 mg p-Aminobenzamidin/kg/Tag zeigen. Die Nebenwirkungen waren vernachlässigbar gering.

Einige monosubstituierte Phenylguanidine haben sich als wirksame und selektive uPA Inhibitoren in vitro erwiesen. Diese kleinen Moleküle zeigen
10 Inhibierungskonstanten im Mikromolarbereich, sie binden jedoch nur in der S1 Tasche von uPA (Yang et al., J. Med. Chem. 33 (1990), 2956-2961). Biologische Untersuchungen mit diesen Verbindungen wurden nicht durchgeführt.

15 Das Diuretikum Amilorid ist ein selektiver uPA-Inhibitor (K_i , uPA = $7 \mu\text{M}$), der die Bildung von Lungenmetastasen nach i.v. Inokulation von Ratten-Brustadenokarzinomzellen verhindert (Kellen et al., Anticancer Res. 8 (1988), 1373-1376). Einige Derivate von 3-Amidino-phenylalanin haben sich ebenfalls als wirksame Inhibitoren von Serinproteasen erwiesen, diese
20 Verbindungen weisen jedoch im allgemeinen nur eine geringe Selektivität für uPA auf (Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40 (1997), 3091-3099; Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhib. 9 (1995), 87-99).

Die derzeit wirksamsten und selektivsten uPA-Inhibitoren sind Derivate von
25 Benzo[b]thiophen-2-carboxamidin (B428 und B623: K_i , uPA = 0,32 bzw. 0,07 μM ; US-Patent 5,340,833). Rabbani et al. (Int. J. Cancer 63 (1995), 840-845) sowie Xing et al. (Cancer Res. 57 (1997), 3585-3593) konnten nach Verabreichung von 4-Iod-benzo[b]-thiophen-2-carboxamidin (B428) eine Abnahme des Tumorwachstums und der Metastasenbildung in einem
30 syngenem Modell für Ratten-Prostatakarzinom bzw. Maus-Mammakarzinom zeigen. Letztere Untersuchungen zeigten eine weitere Abnahme des

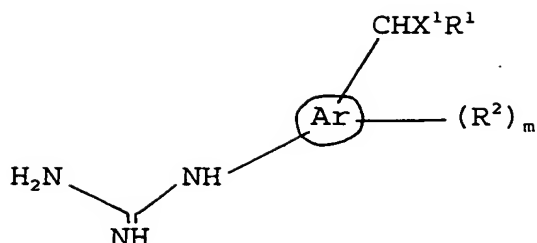
Primärtumorwachstums bei gemeinsamer Verabreichung von B428 mit dem Antiöstrogen Tamoxifen.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue selektive uPA-Inhibitoren bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch neue Arylguanidin- und insbesondere Phenylguanidin-Derivate gelöst. Diese Verbindungen enthalten einen weiteren Substituenten am aromatischen Ringsystem, vorzugsweise in Para-Position zur Guanidingruppe, der eine gegebenenfalls substituierte Methylengruppe gefolgt von Wasserstoff-donor/Akzeptorfunktionalitäten enthält. Aufgrund dieses Substitutionsmusters weisen die Verbindungen eine besonders hohe Wirksamkeit und Selektivität für uPA auf. Diese Wirksamkeit könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß sie

- (1) als Arginin-Mimetikum mit dem Aminosäurerest Asp¹⁸⁹ in der S1-Tasche von uPA wechselwirken und
- (2) eine Wechselwirkung mit der S2- und/oder S3-Tasche von uPA eingehen können.

N-substituierte p-Aminophenylguanidine (ohne Methylenspacer) sowie Derivate von p-Guanidino-phenylalanin (2 Methylengruppen als Spacer) waren als uPA-Inhibitoren unwirksam. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Verbindungen Urethan- oder Harnstoffgruppen für eine Wechselwirkung mit S2 und/oder große hydrophobe Reste wie Arylgruppen oder Cycloalkylgruppen (z.B. Adamantan) für eine Wechselwirkung mit S3.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

Ar ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem bedeutet,

X¹ NR³R⁴, OR³, SR³, COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵ bedeutet,

R¹ H, einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest oder COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵ bedeutet,

R² Halogen, C(R⁶)₃, C₂(R⁶)₅, OC(R⁶)₃ oder OC₂(R⁶)₅ bedeutet,

R³ H oder einen beliebigen organischen Rest bedeutet,

R⁴ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylrest bedeutet,

R⁵ H, einen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Carboxy-alkyl-, Carboxy-alkenyl-, Carboxy-alkinyl-, Carboxy-aryl- oder Carboxy-heteroarylrest bedeutet, wobei die Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- und Heteroarylreste gegebenenfalls substituiert sein können,

R⁶ jeweils unabhängig H oder Halogen, insbesondere F, ist und

m eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist,

oder Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels zur Hemmung des Urokinase-Plasminogenaktivators.

Die Verbindungen können als Salze, vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z.B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen. Die Guanidiniumgruppe kann gegebenenfalls Schutzfunktionen tragen, die vorzugsweise unter physiologischen

Bedingungen abspaltbar sind. Die Verbindungen können als optisch reine Verbindungen oder als Gemische von Enantiomeren oder/und Diastereoisomeren vorliegen.

- 5 In den Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist Ar vorzugsweise ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem mit einem einzigen Ring, insbesondere ein Benzolring. In diesem Ringsystem sind die Substituenten CHX^1R^1 und $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ vorzugsweise in Meta- oder Para-Position und besonders bevorzugt in Para-Position zueinander angeordnet. Darüber
- 10 hinaus kann Ar noch weitere von Wasserstoff verschiedene Substituenten R^2 enthalten. Vorzugsweise ist die Anzahl der Substituenten R^2 0, 1, 2 oder 3, besonders bevorzugt 0 oder 1 und am meisten bevorzugt 0. Bevorzugte Beispiele für R^2 sind Halogenatome (F, Cl, Br oder I), CH_3 , CF_3 , OH, OCH_3 oder OCF_3 .

15

Für die Inhibitoraktivität kritisch ist der Substituent $-\text{CHX}^1\text{R}^1$. R^1 kann H oder ein gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest sein. Der Alkylrest kann eine geradkettige oder verzweigte C_1 - C_{10} -Alkylgruppe, insbesondere eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe, oder eine C_3 - C_8 -Cycloalkylgruppe sein, die beispielsweise mit C_1 - C_3 -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Amino, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen aber auch

20 mit Aryl- oder Heteroarylresten substituiert sein kann. Alkenyl- und Alkenylreste sind vorzugsweise C_2 - C_{10} -Gruppen, insbesondere C_2 - C_4 -Gruppen, die gegebenenfalls wie zuvor angegeben substituiert sein können.

- 25 Aryl- und Heteroarylreste können beispielsweise mit C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_3 -Alkoxy-Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano oder/und Oxo substituiert sein. Weiterhin kann R^1 die Bedeutungen COOR^3 , CONR^3R^4 oder COR^5 aufweisen.

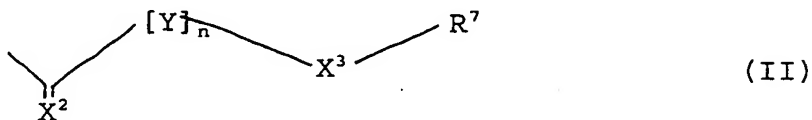
- 30 Die Gruppe X^1 ist ein Rest mit Elektronendonator- oder/und Elektronenakzeptor-Eigenschaften, vorzugsweise NR^3R^4 , OR^3 , SR^3 , COOR^3 , CONR^3R^4 oder COR^5 . Besonders bevorzugt ist X^1 NR^3R^4 . R^3 kann ein beliebiger

organischer Rest oder Wasserstoff sein. R^4 kann Wasserstoff oder ein gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylrest sein, wie zuvor angegeben.

R^5 kann Wasserstoff, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Carboxy-alkyl-, Carboxy-alkenyl-, Carboxy-alkinyl-, Carboxy-aryl- oder Carboxy-heteroaryl-Rest sein. Vorzugsweise ist R^5 ein raumfüllender Rest und enthält mindestens eine Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl- oder/und tert.-Alkylgruppe. Besonders bevorzugt sind Phenylreste, substituierte Phenylreste, tert. Alkylreste und Cycloalkylreste, die gegebenenfalls Substituenten wie vorstehend definiert enthalten können.

Wenn X^1 die Bedeutung NR^3R^4 hat und R^3 und R^4 jeweils unabhängig Wasserstoff oder gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- oder Heteroarylreste (siehe Definition für R^1) darstellen, weist R^1 vorzugsweise eine von Wasserstoff verschiedene Bedeutung, besonders bevorzugt $COOR^3$, $CONR^3R^4$ oder COR^5 , insbesondere $COOR^3$, $CONH_2$, $CO-COOR^5$ oder CHO auf, so daß die Verbindungen I Derivate von Guanidino-Phenylglycin sind.

Besonders bevorzugt ist R^3 eine Gruppe der allgemeinen Formel (II):



worin

X^2 NH, NR^4 , O oder S bedeutet,

X^3 NH, NR^4 , O, S, CO, COO, CONH oder $CONR^4$ bedeutet,

Y $C(R^8)_2$ bedeutet,

R^4 wie in Formel (I) definiert ist,

R^7 H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest oder $-SO_2-R^9$ bedeutet,

R^8 jeweils unabhängig H, Halogen oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl- oder Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet,

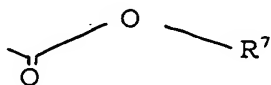
R^9 H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet und

n eine ganze Zahl von 0 bis 2 ist.

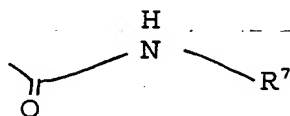
X^2 ist vorzugsweise NH oder O, besonders bevorzugt O. X^3 ist vorzugsweise NH oder -O-. Y ist vorzugsweise CH_2 oder CHR^8 , wobei R^8 vorzugsweise wie R^4 in Formel (I) definiert ist.

R^7 und R^9 sind vorzugsweise wie R^5 in Formel (I) definiert.

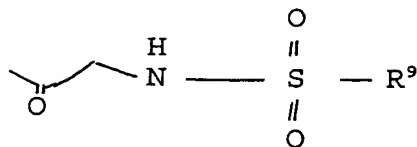
Am meisten bevorzugt ist R^3 eine Gruppe der allgemeinen Formeln IIIa, IIIb oder IIIc:



IIIa



IIIb

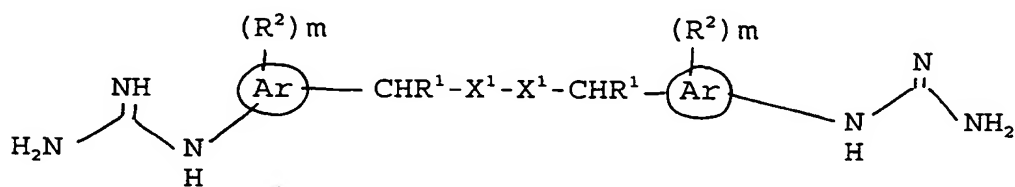


IIIc

worin R^7 und R^9 wie in Formel (II) definiert sind.

Die Substituenten R^7 und R^9 enthalten - ebenso wie R^5 - vorzugsweise raumfüllende Gruppen, die ausgewählt sein können aus gegebenenfalls substituierten Arylresten, insbesondere Phenyl- und substituierten Phenylresten und gegebenenfalls substituierten verzweigte Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylresten, insbesondere mit tertiären C-Atomen wie tert.-Butyl oder Neopentyl oder gegebenenfalls substituierten Cycloalkylresten, insbesondere Bi- oder Tricycloalkylresten wie Adamantyl.

Eine besonders hohe Affinität und Selektivität für uPA haben auch Verbindungen der allgemeinen Formel (IV):



worin Ar , X^1 , R^2 und m unabhängig bei jedem Vorkommen gleich oder verschieden sein können und eine Bedeutung wie in den Formeln (I), (II) und (IIIa-c) definiert besitzen.

Die Verbindungen der Formel (IV) enthalten zwei Arylguanidinogruppen und sind über ihre Substituenten CHR^1X^1 -, die jeweils gleich oder verschieden sein können, miteinander verknüpft.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können beispielsweise ausgehend von p-Amino-benzylamin gemäß den in den Figuren 1 und 2 gezeigten Reaktionsschematen hergestellt werden. 4-Amino-benzylamin kann beispielsweise mit einem Schutzreagenz für Aminogruppen, z.B. Di-tert-butyl-pyrocyanat zu einem geschützten Zwischenprodukt 4-(N-Boc-Aminomethyl)-anillin (1) umgesetzt werden, wobei Boc tert-Butyloxycarbonyl bedeutet. Die aromatische Aminofunktion dieser

Verbindung kann mit einem Guanidinylierungsreagenz, z.B. N,N'-di-Z-N''-triflylguanidin umgesetzt werden, wobei 1-[4-(N-Boc-aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidin (2) entsteht, wobei Z Benzyloxycarbonyl bedeutet. Diese Verbindung kann durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zu 1-[4-(Aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidinium-hydrochlorid (4) umgesetzt werden. Die Verbindung (4) kann wiederum mit reaktiven Verbindungen wie etwa Chlorameisensäureestern, Isocyanaten oder N-Hydroxysuccinimidestern zu den gewünschten Endprodukten umgesetzt werden.

Die Darstellung hydrierungslabiler Verbindungen ist in Figur 2 beschrieben. 4-Amino-benzylamin kann mit einem Schutzreagenz für Aminogruppen, z.B. Benzyloxycarbonyloxy-succinimid zu einem geschützten Zwischenprodukt (6) und dann mit einem weiteren Guanidinylierungsreagenz, z.B. N,N'-di-Boc-1-guanylpirazol zu (7) umgesetzt werden. Diese Verbindung kann zu (8) hydriert und anschließend mit reaktiven Verbindungen zu den gewünschten Endprodukten umgesetzt werden.

Auf entsprechende Weise können auch Verbindungen synthetisiert werden, bei denen X¹ die Bedeutung OR³, SR³, COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵ hat.

Die erfindungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder Trägerstoffen zur Herstellung von Arzneimitteln oder in der Diagnostik verwendet werden. Dabei ist eine Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder/und Peptiden möglich.

Die Arzneimittel können bei Menschen und Tieren topisch, oral, rektal oder parenteral, z.B. subkutan oder intravenös, z.B. in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern, verabreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind zur Bekämpfung von Krankheiten geeignet, die mit einer pathologischen Überexpression von uPA oder/und uPAR assoziiert sind. Sie sind beispielsweise in der Lage, hocheffizient das Wachstum oder/und die Ausbreitung der malignen Tumoren sowie die
5 Metastasierung von Tumoren zu hemmen. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen Tumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z.B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam.

10 Erfindungsgemäße uPA-Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens einen zweifach, vorzugsweise mindestens einen fünffach und besonders bevorzugt einen mindestens zehn- und bis zu 1000-fach geringeren K_i -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen.
15 Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin, Plasmin und Faktor Xa zu hohe K_i -Werte haben.

Die erfindungsgemäßen Substanzen der Formel (I) können in Form von
20 Konjugaten mit physiologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, z.B. mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Mitteln, z.B. Chemotherapeutika wie cis-Platin oder 5-Fluor-uracil, oder Peptiden. Weiterhin können die Substanzen auch in die Membran von Trägervesikeln, z.B. Liposomen, eingebaut werden und somit ein Targeting von in den
25 Trägervesikeln eingeschlossenen Wirksubstanzen, z.B. zytotoxischen Mitteln, wie etwa Doxorubicin, ermöglichen.

Durch die Erfindung wird ein Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere bei Menschen, durch Verabreichung einer
30 wirksamen Menge mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) bereitgestellt. Die Dosierung der Verbindung liegt üblicherweise im Bereich von 0,01 bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Die Dauer der Behandlung

hängt von der Schwere der Erkrankung ab und kann von einer einmaligen Gabe bis zu einer mehrwöchigen oder sogar mehrmonatigen Behandlung, die gegebenenfalls in Intervallen wiederholt werden kann, reichen.

- 5 Schließlich betrifft die Erfindung neue Aryl-Guanidinderivate der allgemeinen Formel (I).

Die Erfindung soll an den folgenden Beispielen und Abbildungen näher erläutert werden. Es zeigt:

10

Figur 1 ein allgemeines Reaktionsschema zur Herstellung erfindungsgemäßer hydrierungsstabiler Substanzen.

Figur 2 ein allgemeines Reaktionsschema zur Herstellung erfindungsgemäßer hydrierungsstabiler Substanzen.

15

Beispiele

Material und Methoden

20

Alle für die Synthese von uPA-Inhibitoren verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien waren von der höchsten kommerziell verfügbaren Qualität und wurden - sofern erforderlich - durch Standardmethoden weiter aufgereinigt und getrocknet. Die analytische HPLC erfolgte auf Nucleosil 100/C18 Säulen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) unter Verwendung eines linearen Acetonitril/2% H₃PO₄ Gradienten (von 5:95 bis 90:10 in 13 min) ESI-MS-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer API 165 Massenspektrometer gemessen.

25
30

Beispiel 1 Synthese von säurelabilen Urethanen, z.B. 4-(N-Boc-aminomethyl)-phenylguanidin (3)

4-(N-Boc-aminomethyl)-anilin (1)

5

4-Amino-benzylamin (2 ml; 17,6 mmol) wurde in 1,4-Dioxan (10 ml) gelöst. Unter Rühren wurde eine wässrige 2 N NaOH-Lösung (17,6 ml; 35,2 mmol) zugegeben. Eine Lösung von Di-tert-butyl-pyrocbonat (3,08 g; 14,1 mmol) in 1,4-Dioxan (30 ml) wurde tropfenweise über 30 min zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf etwa 10 ml konzentriert und zweimal mit Ethylacetat (30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässrigem 5% KHSO₄ (10 ml), wässrigem 5% NaHCO₃, Wasser und Salzlösung gewaschen, über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft, wobei das Produkt als hellgelbe Festsubstanz erhalten wurde.

Ausbeute: 2,38 g (76 %); HPLC: t_R 5,6 min; MS 223 (M + H)⁺, berechnet 222 (M).

20

1-[4-(N-Boc-aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidin (2)

Eine Lösung der Verbindung (1) (500 mg; 2,24 mmol) und N,N'-di-Z-N''-triflylguanidin (1,04 g; 2,24 mmol) (Feichtinger et al., J. Org. Chem. 63 (1998), 3804-3805) in 5 ml Aceton wurde bei Raumtemperatur heftig gerührt. Nach 10 min begann das Produkt in Form eines Präzipitats auszufallen. Nach 2 h wurde das Produkt abfiltriert, im Vakuum getrocknet und aus Methanol umkristallisiert, wobei weiße Kristalle erhalten wurden.

Ausbeute: 1,065 g (89%); HPLC: t_R 13,4 min; MS 533 (M + H)⁺, berechnet 532 (M).

4-(Boc-aminomethyl)-phenylguanidinium-hydrochlorid (3)

50 mg (0,107 mmol) der Verbindung (2) wurden in 5 ml Methanol gelöst, gerührt und für 3 h über einem 10% Palladium-Aktivkohle-Katalysator hydriert. Nach Entfernung des Katalysators durch Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde aus Methanol/Diisopropylether nach Zugabe von einem Äquivalent HCl in 1,4-Dioxan umkristallisiert.

Ausbeute: 28 mg (87%); HPLC, t_R 7,1 min; MS 265 ($M + H$)⁺, berechnet 264 (M).

Beispiel 2 **Synthese von disubstituierten Harnstoffen unter Verwendung von 1-[4-(Aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidinium-hydrochlorid (4) als Baustein, z.B. 4-[3-(-1-Adamantyl)-ureido]-phenyl-guanidinium-hydrochlorid (5)**

1-[4-(Aminomethyl)-phenyl]-2,3-di-Z-guanidinium-hydrochlorid (4)

1 g (1,878 mmol) der Verbindung (2) wurde in 20 ml 3 N HCl (Gas) in 1,4-Dioxan bei 0°C gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde das kristalline Produkt in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 872 mg (99%); HPLC: t_R 10,2 min; MS 433 ($M + H$)⁺, berechnet 432 (M).

4-[3-(-1-Adamantyl)-ureido]-phenyl-guanidinium-hydrochlorid (5)

50 mg (0,107 mmol) der Verbindung (4), 17 mg (0,107 mmol) Adamantyl-isocyanat und 45 µl (0,32 mmol) Triethylamin wurden in 1 ml Ethylenchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Ethylacetat (10 ml) gelöst und dreimal mit 0,1 N wässriger HCl extrahiert. Die organische Phase wurde bis zu Trockene eingedampft. Die Entfernung der Z-Schutzgruppen erfolgte wie für Verbindung (3) beschrieben.

5

Ausbeute: 15 mg (37%); HPLC: t_R 8,6 min; MS 342 ($M + H$)⁺, berechnet 341 (M)

Beispiel 3 Synthese von hydrierungslabilen Verbindungen, z.B. 4-[N-(4-Nitrobenzyloxycarbonyl)-aminomethyl]-phenylguanidin (9)

10

4-(N-Z-Aminomethyl)-anilin (6)

15

4-Amino-benzylamin (1 ml; 8,82 mmol) wurde in 10 ml 1,4-Dioxan gelöst. Eine wässrige 2 NaOH Lösung von NaOH (8,8 ml; 17,64 mol) wurde unter Rühren zugegeben. Dann wurde eine Lösung von Benzyloxycarbonyloxysuccinimid (1,978 g; 7,938 mmol) in 10 ml 1,4-Dioxan tropfenweise über 15 min zugegeben, und das Reaktionsgemisch für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf etwa 10 ml konzentriert und zweimal mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger 5%iger NaHCO₃ Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen, über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, eingedampft und im Vakuum getrocknet, wobei das Produkt als hellgelbe Festsubstanz erhalten wurde.

20

25

Ausbeute: 1,8 g (88%); HPLC: t_R 6,8 min; MS 257 ($M + H$)⁺, berechnet 256 (M).

1-[4-[N-Z-Aminomethyl]-phenyl]-2,3-di-Boc-guanidin (7)

30

Eine Lösung von 495 mg (1,93 mmol) der Verbindung (6) und 599 mg (1,93 mmol) N,N'-di-Boc-1-guanylpirazol (Bernatowicz et al., Tetrahedron

Lett. 34 (1993), 3389-3392) in 5 ml Aceton wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 50 ml Diethylether gelöst, mit wässriger 5% KHSO₄ Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen und über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdampfen des Diethylethers im Vakuum wurde ein hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 670 mg (70%); HPLC: t_R 12,1 min; MS 499 (M + H)⁺, berechnet 498 (M)

1-(4-Aminomethyl)-phenyl-2,3-di-Boc-guanidin-hydrochlorid (8)

Die Verbindung (8) wurde durch katalytische Hydrierung von 600 mg (1,2 mmol) der Verbindung (7) in Ethanol über einem 10% Palladium-Aktivkohle-Katalysator für 1 h erhalten. Nach Filtration des Katalysators wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft, wobei ein Öl erhalten wurde, das aus Isopropanol/Diisopropylether nach Zugabe von 1 Äquivalent HCl in 1,4-Dioxan umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 450 mg (91%); HPLC: t_R 8,1 min; MS 365 (M + H)⁺, berechnet 364 (M)

4-[N-(4-Nitrobenzyloxycarbonyl)-aminomethyl]-phenylguanidin-hydrochlorid (9)

Eine Lösung von 50 mg (0,125 mmol) der Verbindung (8), 27 mg (0,125 mmol) 4-Nitrobenzylchlorformiat und 52 μ l (0,375 mmol) Triethylamin in 1 ml Methylenchlorid wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 30 ml Ethylacetat aufgelöst und dreimal mit 0,5 N wässriger HCl gewaschen. Nach Abdampfen des Ethylacetats wurde der Rückstand in 95% Trifluoressigsäure gelöst und für 1 h gerührt. Nach Abdampfen des

Lösungsmittel wurde das Produkt aus Ethanol/Diisopropylether umkristallisiert.

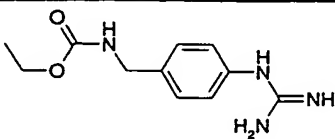
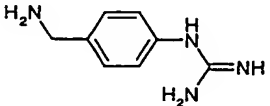
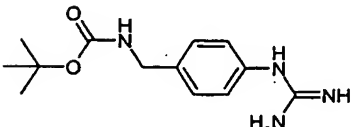
Ausbeute: 35 mg (60%); HPLC: t_R 8,1 min; MS 344 (M + H)⁺, berechnet 343 (M).

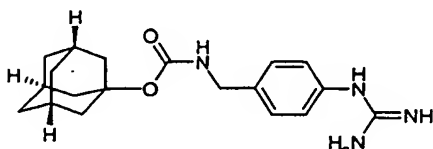
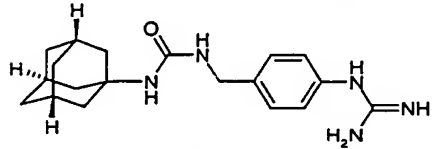
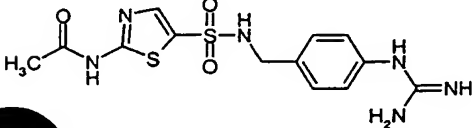
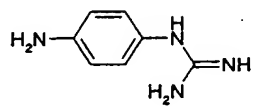
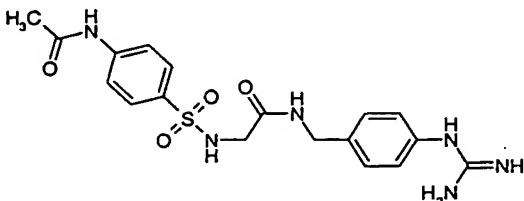
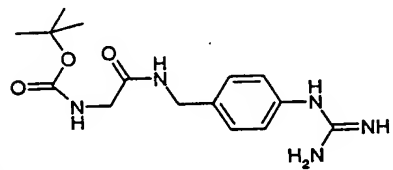
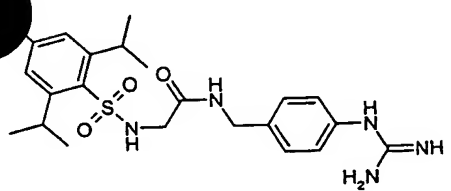
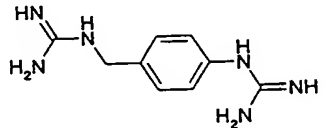
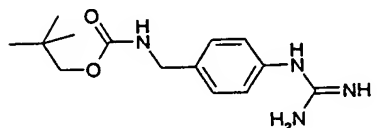
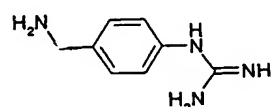
Beispiel 4 In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I

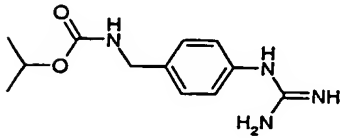
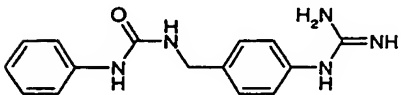
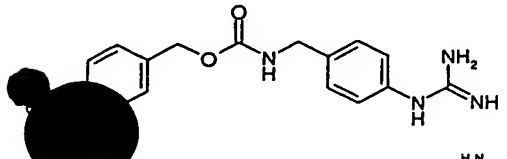
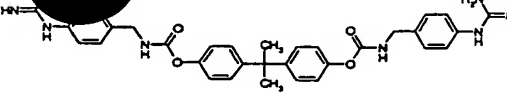
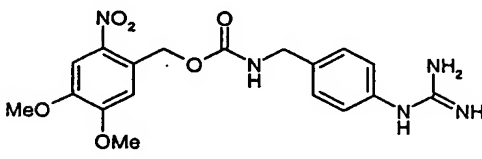
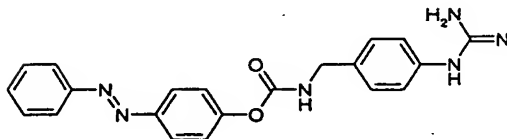
Zur Bestimmung der uPA Inhibitoraktivität wurden 200 μ l Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend, 0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol, pH 8,0), 25 μ l Substrat (Pefachrome UK oder BZ- β -Ala-Gly-Arg-pNA in H₂O; Pentapharm LTD, Basel, Schweiz) und 50 μ l sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland), bzw. eine entsprechende andere Protease bei 25°C inkubiert.

Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels eines Mikroplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K_i -Werte wurden nach Dixon durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K_i -Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%. Die getesteten Inhibitoren und ihre Inhibitionskonstanten für verschiedene Proteasen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

Inhibitor	Name	uPA	Plasmin	K _i [μ M]		
				Thrombin	Trypsin	F Xa
	ST 269	27	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 270	46	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 242	36	>1000	>1000	>1000	>1000

Inhibitor	Name	uPA	Plasmin	Ki [μ M]		
				Thrombin	Trypsin	F Xa
	ST 274	13	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 293	2,4	>1000	600	46	>1000
	ST 282	240	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 267 *	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 296	22	>1000	>1000	42	>1000
	ST 294	37	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 298	42	>1000	>1000	37	>1000
	ST 270	46	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 271	51	>1000	>1000	>1000	>1000
	ST 275	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

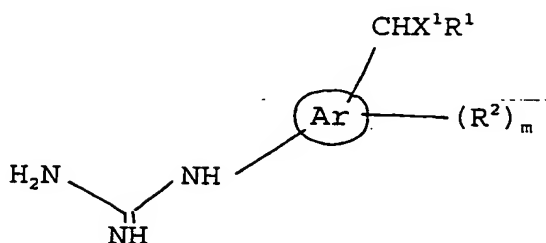
Inhibitor	Name	uPA	Plasmin	Ki [μ M] Thrombin	Trypsin	F Xa
	ST 273	52	130	>1000	>1000	>1000
	ST 301	29	170	>1000	>1000	330
	ST 311	12	???	>1000	200	>1000
	ST 312	2,8	???	>1000	100	>1000
	ST 313	35	???	>1000	???	>1000
	ST 315	11	???	>1000	200	>1000

Die Verbindungen ST293, 312 und 315 weisen einen Ki-Wert für uPA von $> 1000 \mu\text{m}$ auf.

5 Die als ST293 und ST312 bezeichneten Verbindungen erwiesen sich als besonders wirksame und selektive Inhibitoren.

Ansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

Ar ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem bedeutet,

X¹ NR³R⁴, OR³, SR³, COOR³, CONR³R⁴ oder COR⁵ bedeutet,

R¹ H, einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest, oder COOR³, CONR³NR⁴ oder COR⁵ bedeutet

R² Halogen, C(R⁶)₃, C₂(R⁶)₅, OC(R⁶)₃ oder OC₂(R⁶)₅ bedeutet,

R³ H oder einen beliebigen organischen Rest bedeutet,

R⁴ H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynyl-Rest bedeutet,

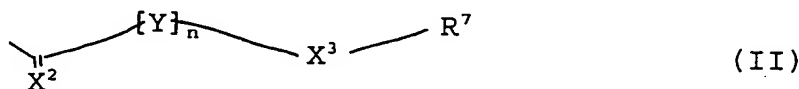
R⁵ H, einen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Carboxy-alkyl-, Carboxy-alkenyl-, Carboxy-alkynyl-, Carboxy-aryl- oder Carboxy-heteroarylrest bedeutet wobei die Alkyl-, Aryl- und Heteroarylreste gegebenenfalls substituiert sein können,

R⁶ jeweils unabhängig H oder Halogen, insbesondere F, ist und

m eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist,

oder Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels zur Hemmung des Urokinase-Plasminogenaktivators.

2. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1, worin Ar einen Benzolring bedeutet.
3. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 2, worin die Substituenten- CHX^1R^1 und -NHC(NH)NH_2 in para-Position zueinander angeordnet sind.
4. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R^3 eine Gruppe der allgemeinen Formel II bedeutet:



worin

X^2 NH, NR^4 , O oder S bedeutet,

X^3 NH, NR^4 , O, S, CO, COO, CONH oder CONR^4 bedeutet,

Y $\text{C(R}^8)_2$ bedeutet,

R^4 wie in Anspruch 1 definiert ist,

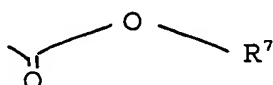
R^7 H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest oder $\text{-SO}_2\text{-R}^9$ bedeutet,

R^8 jeweils unabhängig H, Halogen oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet,

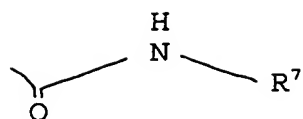
R^9 H oder einen gegebenenfalls substituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- oder/und Heteroarylrest bedeutet und

n eine ganze Zahl von 0 bis 2 ist.

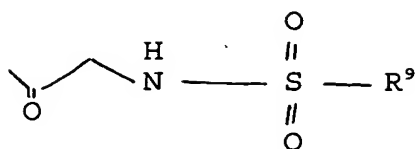
5. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin R^3 eine Gruppe der allgemeinen Formel IIIa, IIIb oder IIIc bedeutet:



IIIa



IIIb

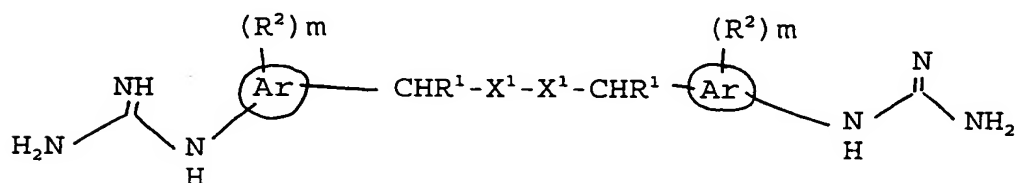


IIIc

worin R^7 und R^9 wie in Anspruch 4 definiert sind.

6. Verwendung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 oder 5, worin R^7 und R^9 ausgewählt sind aus gegebenenfalls substituierten Aryl-, insbesondere Phenyl- und substituierten Phenylresten, und gegebenenfalls substituierten tertiären Alkylresten oder Cycloalkylresten, insbesondere Bicycloalkylresten wie Adamantyl.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen die allgemeine Formel IV aufweisen:



worin Ar , X^1 , R^2 und m unabhängig bei jedem Vorkommen gleich oder verschieden sein können und eine Bedeutung wie in Anspruch 1 definiert besitzen.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Bekämpfung von Krankheiten, die mit einer pathologischen Überexpression von Urokinase oder/und Urokinase-Rezeptor assoziiert sind.

5 9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Tumorbekämpfung.

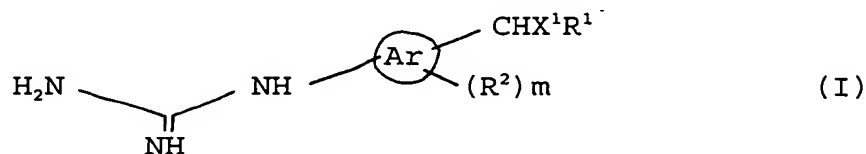
10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9 zur Bekämpfung der Metastasenbildung.

10 11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.

15 12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen wie Pflastern.

20 13. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

25 14. Verbindungen der Formel (I)



30 worin Ar, X¹, R¹, R² und m wie in einem der Ansprüche 1 bis 7 definiert sind.

Zusammenfassung

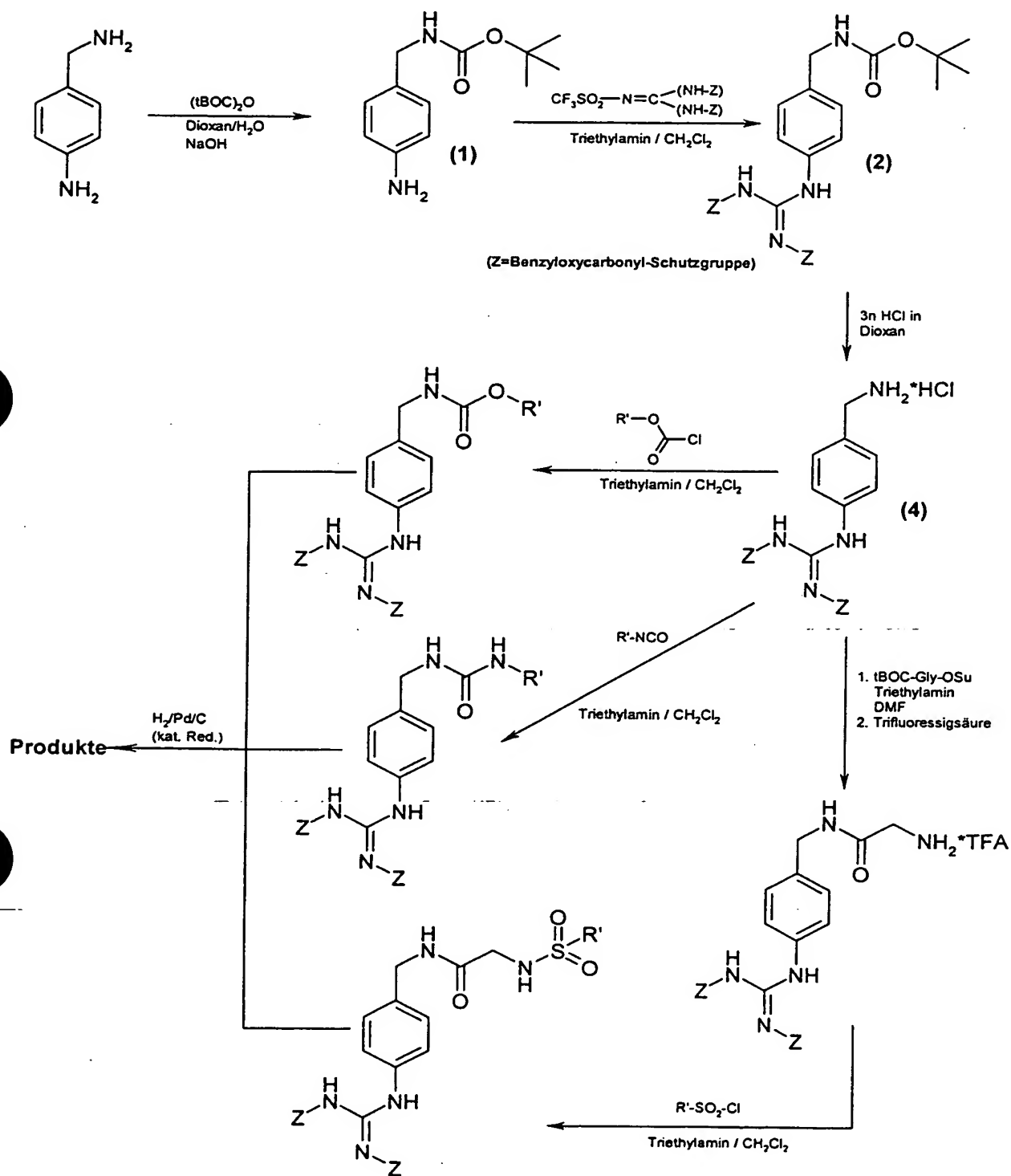
Die vorliegende Erfindung betrifft neue selektive Inhibitoren des Urokinase-
5 Plasminogenaktivators (uPA, EC 3.4.21.31) vom Arylguanidintyp.

10

vo 25. August 1999

25. Aug. 1999

Synthese der hydrierungsstabilen Verbindungen:



Figur 2

Synthese der hydrierungsstabilen Verbindungen:

